

学校编码: 10384

分类号\_\_\_\_\_密级\_\_\_\_\_

学号: 200426132

UDC \_\_\_\_\_

厦 门 大 学

硕 士 学 位 论 文

海洋石油降解菌的分离鉴定及其降解酶基因的研究

Isolation and classification of Marine Oil Degrading

Bacteria and the Analysis of Related Degradation Genes

吴业辉

指导教师姓名: 邵 宗 泽 教授

徐 洵 教授

专 业 名 称: 生物化学与分子生物学

论文提交日期: 2007 年 月 日

论文答辩日期: 2007 年 月 日

学位授予日期: 2007 年 月 日

答辩委员会主席: 王风平 研究员

评 阅 人: \_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

2007 年 7 月

## 厦门大学学位论文原创性声明

兹呈交的学位论文，是本人在导师指导下独立完成的研究成果。  
本人在论文写作中参考的其他个人或集体的研究成果，均在文中以  
明确方式标明。本人依法享有和承担由此论文而产生的权利和责任。

声明人（签名）：

年 月 日

# 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人完全了解厦门大学有关保留、使用学位论文的规定。厦门大学有权保留并向国家主管部门或其指定机构送交论文的纸质版和电子版，有权将学位论文用于非赢利目的的少量复制并允许论文进入学校图书馆被查阅，有权将学位论文的内容编入有关数据库进行检索，有权将学位论文的标题和摘要汇编出版。保密的学位论文在解密后适用本规定。

本学位论文属于

1、保密（ ），在 年解密后适用本授权书。

2、不保密（ ）

（请在以上相应括号内打“√”）

作者签名：

日期： 年 月 日

导师签名：

日期： 年 月 日

## 目 录

中文摘要	I
英文摘要	III
1 前言	1
1.1 海洋石油污染的生物修复	1
1.2 海洋石油降解微生物的多样性	2
1.3 细菌的鉴定与分类	5
1.4 烷烃羟化酶的研究进展	9
1.5 本文的研究目的及意义	16
2 材料与方法	17
2.1 材料	17
2.2 基本方法	27
2.3 海洋石油烃降解菌的富集、分离和鉴定	36
2.4 烷烃降解细菌新种的分类	38
2.5 烷烃羟化酶 <i>AlkB</i> 和细胞色素 P450 单加氧酶的研究	41
3 结果与讨论	45
3.1 马六甲海峡表层海水石油降解菌的富集、分离和鉴定及降解菌群的分析	45
3.1.1 结果与分析	45
3.1.1.1 解菌群中可培养菌株的分离	45
3.1.1.2 REP-PCR	45
3.1.1.3 降解菌群中可培养菌株 16S rDNA 鉴定及其系统发育树的构建	47
3.1.1.4 降解菌群中的优势菌和单菌对应条带的 DGGE 分析	56
3.1.1.5 DGGE 分析石油降解菌群中的未培养菌	62
3.1.1.6 降解菌群中烷烃羟化酶基因 <i>alkB</i> 和细胞色素 P450 烷烃羟化酶基因的 PCR 扩增	66
3.1.1.7 分离到的可培养菌的表面张力的测定	69
3.1.2 讨论	70
3.2 一株烷烃降解菌新种的鉴定	76

3.2.1 结果与分析	76
3.2.1.1 菌株的分离	76
3.2.1.2 表型分析	76
3.2.1.3 脂肪酸组成分析	78
3.2.1.4 16S rDNA 序列比较	79
3.2.1.5 16S-23S ITS 序列比较	80
3.2.1.6 <i>gyrB</i> 序列的比较	81
3.2.1.7 G+C 含量和 DNA-DNA 杂交	82
3.2.1.8 烷烃羟化酶基因 <i>AlkB</i> 的分析	82
3.2.1.9 细胞色素 P450 烷烃羟化酶基因的分析	85
3.2.2 讨论	86
3.2.3 食烷菌新种的描述	87
<b>3.3 柴油食烷菌 B-5 烷烃羟化酶 <i>AlkB</i> 和细胞色素 P450 的功能分析</b>	<b>88</b>
3.3.1 结果与分析	88
3.3.1.1 柴油食烷菌 B-5 烷烃羟化酶基因 <i>alkB</i> 的敲除及其烷烃利用范围的测定	88
3.3.1.2 柴油食烷菌细胞色素 P450 烷烃羟化酶基因的克隆	92
3.3.1.3 柴油食烷菌 B-5 细胞色素 P450 烷烃羟化酶的 Southern Blot 分析	94
3.3.2 讨论	96
<b>小结和展望</b>	<b>98</b>
<b>参考文献</b>	<b>100</b>
<b>附录</b>	<b>109</b>
<b>致谢</b>	<b>110</b>

# CONTENTS

<b>Chinese abstract</b> .....	<b>I</b>
<b>English abstract</b> .....	<b>III</b>
<b>1 Forword</b> .....	<b>1</b>
1.1 Bioremediation of marine petroleum contaminant.....	1
1.2 Diversity of marine petroleum-degrading microorganism.....	2
1.3 Identification and classification of bacteria .....	5
1.4 Research progress of alkane hydroxylase .....	9
1.5 Purpose and significance of this research .....	16
<b>2 Materials and methods</b> .....	<b>17</b>
2.1 Materials .....	17
2.2 Basic methods .....	27
2.3 Enrichment and identification of marine oil-degrading microorganisms...	36
2.4 Classification of new bacteria .....	38
2.5 Cloning and analysis of alkane hydroxylase.....	41
<b>3 Results amd discussion</b> .....	<b>45</b>
3.1 Analysis of oil-degrading consortia from seawater of Malacca.....	45
3.1.1 Results and analysis.....	45
3.1.1.1 Isolation of culturable bacteria in the oil-degrading consortia.....	45
3.1.1.2 REP-PCR.....	45
3.1.1.3 Phylogenetic analysis of cultured strains in the oil-degrading consortia...	47
3.1.1.4 Analysis of dominant populations of oil-degrading consortia by DGGE...	56
3.1.1.5 Analysis of uncultured dominant strains of oil-degrading consortia by DGGE and their phylogenesis.....	62
3.1.1.6 Amplification of partial Alkane hydroxylase gene of <i>alkB</i> and cytochrome P450.....	66
3.1.1.7 Assay of surface tension of culturable strains.....	69
3.1.2 Discussion.....	70

<b>3.2 Description of <i>Alcaniorax hongdocksii</i> sp. nov., a novel alkane-degrading bacterium</b>	<b>76</b>
3.2.1 Results	76
3.2.1.1 Isolation	76
3.2.1.2 Phenotypic analysis	76
3.2.1.3 Cellular fatty acid analysis	78
3.2.1.4 16S rRNA sequence comparison	79
3.2.1.5 16S-23S ITS sequence comparison	80
3.2.1.6 gyrB sequence comparison	81
3.2.1.7 G+C content and DNA-DNA hybridization	82
3.2.1.8 Deduced partial alkane hydroxylase AlkB sequence comparison	82
3.2.1.9 Deduced partial alkane hydroxylase P450 sequence comparison	85
3.2.2 Discussion	86
3.2.3 Description of <i>Alcaniorax hongdocksii</i> sp. nov.	87
<b>3.3 Analysis the function of alkane hydroxylase (AlkB and cytochrome P450) in <i>Alcaniorax dieselolei</i> B-5</b>	<b>88</b>
3.3.1 Results	88
3.3.1.1 Knock out the gene of <i>alkB</i> and analysis of alkanes-degrading range of the mutant B-5 $\Delta$ <i>alkB</i>	88
3.3.1.2 Amplification and comparison of partial cytochrome P450 gene	92
3.3.1.3 Analysis Cytochrome P450 monogenase by Southern Blot	94
3.3.2 Conclusion and discussion	96
<b>Conclusion and prospect</b>	<b>98</b>
<b>Reference</b>	<b>100</b>
<b>Appendix</b>	<b>109</b>
<b>Acknowledgements</b>	<b>110</b>

# 海洋石油烃降解菌的分离鉴定及其降解酶基因的研究

## 摘 要

当前, 海洋的污染正在日趋加剧, 其中海洋的石油污染尤为严重。世界日原油产量大约  $10^8$  barrels, 其中 50% 经由海洋运输。即使是偶尔发生的溢油事件, 也会对海洋环境和海岸生态系统造成了恶劣和长期的影响。目前普遍认为生物修复是清除海洋石油污染的有效手段。从海洋石油污染较严重的环境中进行石油烃降解微生物的分离、培养, 以及对这些重要降解菌的鉴定是当前海洋环境微生物学研究的重点和热点。烷烃羟化酶是微生物降解烷烃过程中的第一步酶, 也是整个降解途径中的关键酶。它们能够使极性、难溶的烷烃转变为溶解性高的醇类物质, 这不仅有利于微生物本身对烷烃的降解, 也有利于参与降解的其它微生物的利用。此外, 烷烃羟化酶可以用作生物催化机来生产一些精细化工产品。因此, 对烷烃降解菌和烷烃羟化酶的研究具有较高的理论和应用价值。

本文以柴油为唯一碳源, 从马六甲海峡 10 个不同站点的表层海水样品中富集到了十个柴油降解菌群, 并对各菌群的结构进行了分析。从 10 个菌群中共分离到 48 株细菌, 分属于 17 个不同的属。其中许多菌株都有较强的柴油降解能力。降解菌群中可培养菌的系统发育分析表明, 它们分别属于变形菌类群、放线菌类群、黄杆菌类群, 多样性丰富。其中变形纲类群  $\gamma$  亚群 (59%)、 $\alpha$  亚群 (33%) 较为丰富。PCR-DGGE 分析表明, 食烷菌、假单胞菌、海旋菌、海杆菌、新鞘氨醇单胞菌、不动杆菌、红球菌、*Parvibaculum*、苍白杆菌属的细菌是优势菌。其中大多数菌已报道可以降解原油或柴油。从马六甲海峡红灯码头站点分离到的 A-11-3 对柴油具有很强的降解能力及很广的烷烃降解范围 (C8~C36)。其 16S rRNA 与已报道的博克岛食烷菌 SK2 (*Alcanivorax borkumensis* SK2<sup>T</sup>) 有最高同源性的 96.5%。通过生理生化特性分析、脂肪酸组成分析、G+Cmol% 含量分析、ITS 序列以及促旋酶 *gyrB* 序列等分析, 表明菌株 A-11-3 是属于食烷菌属的一个新种, 命名为马六甲食烷菌 (*Alcanivorax Malaccasis*)。从该菌株中获得了一个新的烷烃羟化酶 AlkB (*Burkholderia xenovorans* LB400, 69%) 和一个属于细胞色素 CYP153 家族的 P450 烷烃羟化酶的部分序列。

从本实验室分离并鉴定的柴油食烷菌模式种 B-5 (*A. dieselolei*) 获得了一个新的



烷烃羟化酶 *AlkB*, 以前的实验证明, 该基因编码一个有功能的烷烃羟化酶。本实验在 B-5 中对 *alkB* 基因进行了敲除, 发现基因敲除后的突变株对烷烃的降解范围和降解能力与原始菌株相比, 几乎没有差别, 这说明了在 B-5 中还存在其它的烷烃羟化酶系统。用兼并引物和 Tail-PCR 扩增的方法获得了 367 个氨基酸的细胞色素 P450 酶, 其与博克岛食烷菌 SK2 中 CYP153 P450 烷烃羟化酶有最高相似性, 为 84.9%。系统发育分析表明, B-5 中得到的 P450 酶属于细胞色素 CYP153 家族。还获得了位于其下游且紧邻 P450 烷烃羟化酶的 541aa 的醇脱氢酶全长。在 B-5 及在突变株 B-5 $\Delta$ *alkB* 中分别进行 CYP 153 P450 基因敲除的单双突变株已经构建好, 突变株的烷烃降解能力实验正在进行中。此外 B-5 中已获得两个烷烃羟化酶 *AlkB* 及 P450 在不同烷烃的诱导下的表达情况的研究正在进行之中。

关键词: 海洋石油污染; 降解菌群; 多样性; 马六甲食烷菌; 烷烃羟化酶

## Isolation and classification of Marine Oil Degrading Bacteria and the Analysis of Related Degradation Genes

### ABSTRACT

Petroleum pollution has been a serious problem in environments, especially in the marine environments. The annual world production of crude oil is 70 million barrels per day, with approximately 50% of this being transported by sea. Occasionally oil tanker accidents result in large-scale marine and coastal pollution. Oil pollution is likely to remain a significant threat to marine and coastal wildlife and ecosystems. It has long been recognized that many microorganisms can use medium or long-chain *n*-alkanes as sources of carbon and energy, which has stimulated many studies on the usefulness of these organisms in the bioremediation of oil spills and contaminated sites. It's very important and necessary to isolate and culture and detect petroleum-degrading microorganisms from the polluted environment. In many microorganisms the first step for alkane degradation is the terminal oxidation of the molecule by an alkane hydroxylase, which has been proven to be useful and versatile biocatalyst, opening the possibility of its use in the industrial production of fine chemicals.

By enrichment with crude oil or diesel as the sole carbon source, the diversity of petroleum-degrading bacteria in the surface water of the Strait of Malacca were surveyed. Ten samples resulted in 10 petroleum -degrading consortia, whose structures were analyzed by the combined methods of DGGE and CFU counting. DGGE revealed quite diversity in bacterial population. We isolated 48 strains in total and they belong to 17 different genus. They belong to *Proteobacteria*, *Acinobacteria*, *Flavobacteria*, respectively. Members of the  $\gamma$ -*Proteobacteria* (59%) were found to be most abundant.  $\alpha$ -*Proteobacteria* (33%) were the second dominant bacteria. The results showed that the dominant strains were detected phylogenetically close to *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Rhodococcus*, *Marinobacter*, *Novosphingobium*, *Halomonas*, *Thalassospira*, *Salinisphaera*, *Parvibaculum* respectively.

Most of these dominant populations were reported as petroleum-degraders. *Alcanivorax*, *Pseudomonas*, *Novosphingobium* had a wide distribution, especially *Alcanivorax*, *Marinobacter*, *Novosphingobium* were important petroleum-degraders in

marine environment. Among them, isolate A-11-3 showed the predominant biodegradability to diesel fuel and was able to utilize various *n*-alkanes as the sole carbon source, ranging in chain length at least from C8 to C36. On the basis of 16S rRNA gene sequence similarity, B-5 was shown to belong to the  $\gamma$ -*Proteobacteria*. Highest similarity values were found with *Alcanivorax borkumensis* (96.5%), *A. venustensis* ISO4<sup>T</sup> (94.22%), *A. jadensis* T9 (94%), *A. dieselolei* B-5<sup>T</sup> (94.82%), respectively. According to results of physiological and biochemical tests, cellular fatty acid composition, comparisons of 16S-23S internal transcribed spacer sequences, the sequence of *gryB* gene and comparisons of the partial deduced amino acid sequence of alkane hydroxylase, both strains were affiliated to the genus *Alcanivorax* but were differentiated from recognized *Alcanivorax* species. Therefore, a novel species, *Alcanivorax Malaccasis* sp. nov., is proposed.

The alkane hydroxylase in B-5 encodes a functional hydroxylase. A B-5 *alkB* gene knockout mutant was constructed. But it was surprised to find that the alkane-degrading capability and the region of alkanes the mutant use was the same with the wildtype strain. This result proved that there were other type alkane hydroxylase systems in B-5. By the method of degenerated primers and Thermal asymmetric interlaced PCR, a CYP153 alkane hydroxylase gene, which encoding a 367aa polypeptides fragment was amplified, and a full-length of alcohol dehydrogenase (ADH), which is the second key enzyme in the course of alkane-degrading, was amplified too. To detect whether there were more other alkane hydroxylase systems in B-5, whether the putative CYP153 P450 encodes a functional alkane hydroxylase and responds for which length of alkanes, P450 gene was knocked out in B-5 and B-5  $\Delta$  *alkB*. Further analysis is on the progress.

**Keywords:** marine petroleum pollution; oil degrading consortia; biodiversity; *Alcanivorax Malaccasis*; alkane hydroxylase

# 1 前言

## 1.1 海洋石油污染的生物修复

### 1.1.1 海洋石油污染的现状和危害

当前,海洋的污染正在日趋加剧,其中海洋的石油污染尤为严重。目前,世界所需石油的 2/3 经海路运输,经常运行在航道上的油轮大约有 7000 艘之多。大型油轮失事以后,其中的原油部分或全部流入海洋中,从而造成严重的海洋石油污染,例如,1968 年 Torrey Canyon 号油轮在英国海岸失事,流出原油 10 万多吨;1975 年 6 月 7 日,日本油轮“昭和丸”号在马六甲海峡泄油 23.7 万吨;1978 年 3 月 17 日 Amoco cadiz 号在法国 Portsall 外出事,流失原油约 21 万多吨。据联合国环境规划署报告,流入海洋的石油每年为 200 万吨至 2000 万吨,由于航运而排入海洋的石油污染物达 160~200 万吨,其中 1/3 左右是油轮在海上发生事故导致石油泄漏造成的。每年原油的泄漏就可以在整个地球的海洋表面形成厚达 20 个油分子的油膜。

石油污染给海洋环境和海洋生态系统带来了严重的危害,直接或间接的影响着人类的生存和可持续发展。其主要表现在以下几个方面:

1) 影响海气系统间物质和能量的交换。石油是不溶于水的化合物,进入海洋中的石油会在海面上形成大面积的油膜,影响了海气系统物质和能量的交换。据实测,每滴石油在水面上能够形成 0.25 平方米的油膜,每吨石油可能覆盖  $5 \times 10^6$  平方米的水面。油膜使大气与水面隔绝,减少进入海水的氧的数量,从而降低海洋的自净能力。油膜覆盖海面还会阻碍海水的蒸发,影响大气和海洋的热交换,改变海面的反射率,减少进入海洋表层的日光辐射,对局部地区的水文气象条件可能产生一定的影响。

2) 破坏海洋生态系统。海洋石油污染的最大危害是对海洋生物的影响,油膜和油块能粘住大量鱼卵和幼鱼,使鱼卵死亡、幼鱼畸形,还会使鱼虾类产生石油臭味。石油在海面上的氧化和分解需要大量的氧气,据统计,1 升石油完全氧化达到无害程度,大约需要 4 万升的溶解氧。造成海洋中  $O_2$  减少,  $CO_2$  的相对增多,以及进入海水中的太阳光减少,使海洋中大量藻类和微生物死亡,厌氧生物大量繁衍,海洋生态系统的食物链遭到破坏,从而导致整个海洋生态系统的失衡。石油泄漏到海面,几小时后,便会发生光化学反应,生成醌、酮、醇、酚、酸和硫的

氧化物等有害物质,会在污染海域的鱼、虾等海鲜体中积累。海洋一旦遭到油污,后患将持续几十年。1991 年海湾战争期间泄漏入海洋的石油数量高达 150.7 万吨,使当地沿岸生态遭受毁灭性破坏,生态恢复至少需要 100 年时间。

3) 制约人类社会和环境的可持续发展。海洋是一个巨大的资源宝库,为人类的可持续发展提供重要的物质基础。海洋石油污染影响着海洋养殖和捕捞业的发展;石油污染物的生物富集作用不仅对海洋生物有毒害作用,可以通过食物链最终富集在人体内,从而对人类健康造成严重的危害<sup>[1,2]</sup>;海洋石油污染物对沿海造盐业、海洋化工等生产造成影响;海洋荒漠化使海洋水循环蒸发环节减弱,进而影响整个系统,使陆地上降水减少、荒漠化现象更加严重,对全球灾害性天气的产生和气候变化也具有明显的影响,不利于环境的可持续发展。

### 1.1.2 生物修复在海洋石油污染治理中的应用

目前,常用的海洋石油污染的治理方法主要有物理修复、化学修复和生物修复。与化学、物理方法相比,生物修复对人和环境造成的影响小,且修复费用仅为传统物理、化学修复的30 %~50 %<sup>[3]</sup>。生物修复以其投入小,无二次污染的优势被视为最有前途的环境治理手段<sup>[4~8]</sup>。

生物修复(bioremediation)指生物催化降解环境污染物,减少或最终消除环境污染的受控或自发过程<sup>[9]</sup>。生物修复的基础是自然界中微生物对污染物的生物代谢作用,由于自然界的生物修复过程一般较慢,难以实际推广应用,因此一般指人为促进条件下的生物修复。20 世纪 80 年代末美国在 Exxon Vadez 油轮石油泄露的生物修复项目中,短时间内清除了污染,治理了环境,是生物修复成功应用的开端,同时也开创了生物修复在治理海洋污染中的应用<sup>[4, 10, 11]</sup>。

目前实际应用的生物修复方法主要有两种:微生物法和微生物生态法。微生物法是利用从污染现场筛选得到的高浓度本土菌液或是利用市售的成品菌株来治理被污染环境。微生物生态法则是通过识别和调节影响本土微生物群落降解能力的外界因素,来达到加快生物降解速率的目的<sup>[12]</sup>

## 1.2 海洋石油降解的微生物及其多样性

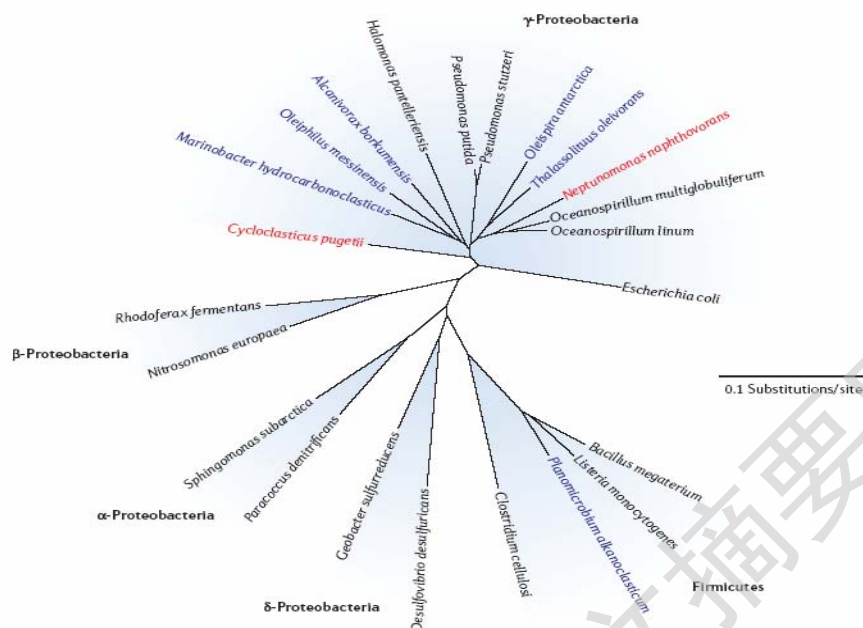
海洋微生物,一般指分离自海洋环境,其正常生长需要海水,并可在寡营养、低温条件下生长繁殖、形体微小、单细胞或个体结构较为简单的多细胞、甚至没有细胞结构的微生物。然而,有些分离自海洋的微生物,其生长不一定需要海水,

但可产生不同于陆地微生物的代谢物（如溴代化合物抗生素）或拥有某些特殊的生理性质（如盐耐受性、液化琼脂等），也被视为海洋微生物<sup>[13]</sup>。

海洋中常发现的细菌主要属于以下系统类群：变形细菌群、革兰阳性细菌群（包括高 G+C 和低 G+C）、CFB 类群（噬纤维菌属/屈扰杆菌/拟杆菌类群）、浮霉菌、衣原体及一些尚未获得培养的系统类群等。其它细菌类群也存在于海洋环境中，但较少有研究报道。

海洋石油烃降解菌早在一个世纪前就已经被分离到<sup>[14]</sup>。最近文献综述<sup>[15]</sup>统计有79个属的细菌能利用烃类物质做为唯一的碳源和能源，9个属的蓝藻、103个属的真菌、14个属的海藻能降解或转化烃类物质。大多数原核降解菌是属于  $\alpha$  -、 $\beta$  -、 $\gamma$  -Proteobacteria 和 Actinomycetales 的高GC含量的革兰氏阳性菌。最近，发现 *Bacillus*、*Geobacillus* 和 *Thermus* 也降解烷烃，此外，*Flavobacteria* 和 *Sphingobacteria* 也从石油污染的环境分离到。

在海洋环境中也生活着各种各样的石油烃降解菌。在过去的十年里，分离到了许多的烷烃和芳香烃类降解菌（见图1-1），其主要属于-紫细菌类群的菌株。包括：*Alcanivorax* spp.<sup>[16]</sup>、*Cycloclasticus* spp.<sup>[17]</sup>、*Oleiphilus* spp.<sup>[18]</sup>、*Oleispira* spp.<sup>[19]</sup>、*Thalassolituus* spp.<sup>[20]</sup>，*Marinobacter*<sup>[21]</sup>、*Neptunomonas*<sup>[22]</sup>、和 *Planomicrobium*（以前被认为动球菌属 *Planococcus*）<sup>[23]</sup> 属的一些菌株。其中 *Alcanivorax* spp.，*Oleiphilus* spp.，*Oleispira* spp.、*Thalassolituus* spp. 和 *Planomicrobium alkanoclasticum* MAE2 是专业的烃类降解菌，能利用不同链长的支链和直链饱和烷烃。*Cycloclasticus* spp. 能利用萘、菲和蒽等多环芳烃（PAHS）。*Oleiphilus* 和 *Oleispira* 利用脂肪烃、烷醇和烷酸。。还有很多是“非专业”的烃类降解菌，例如 *Vibrio*、*Pseudoalteromonas*、*Marinomonas* 和 *Halomonas* 能够降解菲和屈等稠环芳香烃<sup>[24]</sup>。另外，一些从海洋环境中分离获得的烃类降解菌经鉴定属于陆地的烃类降解菌，例如：萘降解菌 *Staphylococcus* 和 *Micrococcus*<sup>[25]</sup>、2-甲基菲降解菌 *Sphingomonas*<sup>[26]</sup> 和烷烃降解菌 *Geobacillus*。



资料来源：参考文献[15]

图 1—1 有氧条件下主要的烃类降解细菌的系统发育树

说明：蓝色字体表示的细菌名称能降解饱和烃类；红色字体表示的细菌名称能降解多环芳烃；黑色字体表示的细菌名称不能降解烃类物质。

### 1.2.1 食烷菌在清除石油污染过程中的重要性

食烷菌 (*Alcanivorax*) 是海洋石油污染环境中重要和优势的石油烷烃降解菌，也是近年来海洋石油污染环境中被重点研究的对象。该属目前已报道有四个种，第一个种是1998年由 Yakimov 等人分离到的 *A. borkumensis*<sup>[16]</sup>，另外三个是 *A. venustensis*<sup>[27]</sup>；*A. jadensis*<sup>[27]</sup> 和 *A. dieselolei*<sup>[28]</sup>。该属的主要特征是能利用直链和支链的烷烃作为唯一的碳源，如柴油食烷菌B-5能利用C5~C36的烷烃为唯一碳源生长，而不能以任何的氨基酸和糖类作为碳源，是专业的烷烃降解菌株。

目前在世界范围内从表层海水到深海沉积物中均分离或在未培养的菌群中检测到了食烷菌<sup>[15]</sup>，是广泛存在的菌属。Syutsubo<sup>[29]</sup>等人在石油污染的海水样品中，在补充适当的N、P源后的1—2周的时间内，食烷菌由开始的劣势群体迅速成为优势菌群，占被分析菌群细菌细胞总数的70%—90%。同样，Roling<sup>[30]</sup>等人在实验室和户外进行的石油污染的生物修复实验中，在不加油的海水样品中用16S rRNA序列扩增是检测不到食烷菌的，当样品向其中补加N、P源后，2周内，在所构建

的16S rRNA文库中,只加油的沉积物和加油同时又补加M、P营养盐的的沉积物中,食烷菌的组成量分别增加了30%和70%,同时,这些结果也通过对食烷菌的烷烃羟化酶基因*alkB*进行监测,该基因只能在食烷菌16S rRNA丰度高的样品中检测到。两个结果保持一致。这说明了食烷菌在一般情况下只维持很少的数量,当提供合适的条件(如补充N、P源),其能优先利用烃类物质作为唯一的碳源和能源,它们便能快速的生长并迅速成为优势菌群。

这些结果都说明食烷菌在对海洋油污染环境的生物修复过程中起到了主要作用,为了了解食烷菌能够在这样的培养条件下能够成为优势菌种的原因,Hara<sup>[31]</sup>等人把海水中的土著食烷菌和外源的烷烃降解菌威尼斯不动杆菌(*Acinetobacter venetianus*)进行竞争性试验,结果表明由于食烷菌对于支链烷烃具有很强的降解能力,所以它能够在油污的海水中最终成为优势菌。

酶是烷烃降解过程中的关键酶。其包括烷烃羟化酶 $AlkB$ 和细胞色素P450烷烃羟化酶。Hara<sup>[32]</sup>等人从食烷菌的模式菌株博克岛食烷菌(*Alcanivorax borkumensis*) SK2 中克隆到了两个烷烃羟化酶基因(*alkB1* 和*alkB2*)。并分别阻断这两个基因,对所获得的突变株进行生长特性的测定,结果表明*alkB1* 基因对C6的降解是必需的,然而不管是把这两个基因分别单敲除还是双敲除,突变株在C8-C16的烷烃中生长时均没有表现出明显的减弱。这说明除了*alkB1* 和*alkB2* 之外,菌株SK2 内还含有其它参与降解的烷烃羟化酶。最近,该菌株的全基因组测序已完成<sup>[33]</sup>,在其基因组中有三个细胞色素P450基因(P450a、P450b、P450c)和一个假定的黄素结合的单加氧酶,其中一个细胞色素P450基因属于CYP153 P450家族的烷烃羟化酶。这些细胞色素P450基因可能也参与到了烷烃的降解过程。这种多基因策略可能是食烷菌具有强烷烃降解能力的主要原因。博克岛食烷菌SK2的全基因组测序工作的完成,可以更好的了解食烷菌高效降解石油烃的能力、调节和降解相关的特征(如表面活性剂的产生、膜稳定性、开发驱油的生物膜等)。此外,食烷菌的一些菌株能产生特有的胞外和细胞结合的表面活性物质葡萄糖脂<sup>[16]</sup>,其能使水的表面张力由72mN/m降低到29mN/m,这也是食烷菌之所以在石油污染的生物降解过程中扮演重要角色的主要原因。

### 1.3 细菌的鉴定与分类

微生物在食物链中处于分解者的地位,是构成地球生物圈的重要成员。据



Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士论文摘要库